

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Лейберова А.К, Храмцова Ю.С.

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н.

Ельцина, Екатеринбург, Россия

anna.leiberova@list.ru hramtsova15@mail.ru

Аннотация. Актуальным является разработка методики получения культуры животных клеток, которую впоследствии можно будет использовать в качестве экспериментальной модели для проведения как фундаментальных исследований, так и доклинических испытаний лекарственных средств. Таковой является и разработка методики выделения линии перитонеальных тучных клеток из перитонеальной жидкости и ее культивирования в специализированных условиях. Полученная культура является подходящей экспериментальной моделью для проведения фундаментальных исследований тучных клеток – изучения их свойств и их взаимодействия с различными биологически активными веществами и другими клетками в со-культуре *in vitro*, и для проведения доклинических исследований специализированных лекарственных препаратов на ней.

Ключевые слова: перитонеальные тучные клетки, мышь, прозерин, культура клеток, кетотифен, *in vitro*.

NEW METHOD FOR OBTAINING A CULTURE OF PERITONEAL MAST CELLS

A. K. Leiberova, Y. S. Khramtsova

Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

Abstract. Currently, the development of a method for obtaining a culture of animal cells, which can later be used as an experimental model for conducting both basic research and preclinical trials of drugs, is urgent. The development of a technique for isolating a line of peritoneal mast cells from the peritoneal fluid and its cultivation in specialized conditions is also urgent. The resulting mast cell culture is a suitable experimental model for fundamental research - studying the properties of mast cells and their interaction with various biologically active substances and other cells in co-culture *in vitro*, and for conducting preclinical studies of specialized drugs on it.

Key words peritoneal mast cell, mouse, proserin, cell culture, ketotifen, *in vitro*.

Введение

Тучные клетки – клетки соединительной ткани. Их предшественники, недолго циркулируя в крови, достигают какого-либо органа, и дифференцируются там в зрелые клетки. Чаще всего тучные клетки локализуются в рыхлой соединительной ткани (соединительнотканые тучные клетки) либо в слизистых оболочках органов (мукозальные тучные клетки) [1].

Тучные клетки участвуют в развитии воспаления, являются основными клетками – мишенями аллергических реакций [2], принимают участие в регуляции свертывания крови [3], жировом обмене, обеспечивают постоянство состава соединительной ткани, влияя на микроциркуляторное русло, на размножение, миграцию и функцию фибробластов, макрофагов, эндотелиоцитов, лейкоцитов [4]. Такая многофункциональность тучной клетки объясняется её уникальной способностью реагировать на специфические антигены дегрануляцией [5].

Проблема, связанная с изучением тучных клеток – это труднодоступность к образцам тканей [6], но из-за своей уникальности и высокоспециализированности, неоднозначной роли в физиологических механизмах и практически повсеместной встречаемости в большинстве тканей тучные клетки являются актуальными объектами исследования, и поэтому в их культивировании и получении в дальнейшем культуры есть необходимость.

К сожалению, тучные клетки составляют малую часть доли всех клеток соединительной ткани [7], что усложняет их выделение из неё и отделение от других клеток. В этом случае их количества, взятого из биологического материала, может быть недостаточно для культивирования [8]. Следовательно, необходимо выбрать биологический материал, который соответствовал бы двум принципам: легкости извлечения и возможности быстрого разделения тучных клеток от других клеток. Этим двум принципам удовлетворяют перитонеальные тучные клетки. Поэтому целью нашего исследования стала разработка методики культивирования перитонеальных тучных клеток, основой которой послужили уже наработанные по данной теме материалы [9, 10].

Образцы и методика эксперимента

В исследовательской работе были использованы мыши линии СВА (штамм C57BL/6N) самцы в возрасте от 8 до 14 недель.

У двух групп животных извлекали перитонеальную жидкость внутрибрюшинным лаважем: с предварительным введением 0,05 % прозерина внутримышечно в концентрации 0,04 г/кг мыши и без прозерина. Животных выводили из эксперимента диэтиловым эфиром. После проводили поверхностную стерилизацию тела животного мыльным раствором и этиловым спиртом, вносили в ламинарный бокс и закрепляли на блоке для проведения

дальнейших манипуляций. Удаляли кожу с брюшка с помощью ножниц и обрабатывали поверхность голого брюшка спиртом. Затем аккуратно вводили 7 мл среды RPMI и 5 мл воздуха в брюшную полость, используя шприц на 10 мл, снабженный иглой 27 G. Встряхивали мышь в течение 3 минут для максимального перехода клеток брюшины в образовавшуюся клеточную суспензию. Затем проводили забор клеточной суспензии из тела мыши. При аспирации жидкости из брюшной полости (0,5 мл/с) обычно собирали 3,5–5 мл клеточной суспензии.

Собранную из тела мыши клеточную суспензию помещали в центрифужную пробирку на 15 мл и центрифугировали при 300 g в течение 5 минут. В ламинарном боксе аспирировали надосадочную жидкость и добавляли к осадку полную питательную среду в объеме 5 мл (79 % RPMI, 20 % Fetal Calf Serum, 1 % Pen Strep). Полученную клеточную суспензию переносили в культуральный флакон и добавляли факторы роста IL-3 в объеме 10 нг/мл и SCF в объеме 30 нг/мл. Инкубировали в течение 1 недели в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °C и 5 % CO₂ со сменой среды каждые 48 часов. Изучение состояния клеток в культуре осуществляли с помощью инвертированного микроскопа.

Пассажи проводили на 7 сутки и на 9 сутки для последующего сравнения результатов количественной оценки полученных культур после пересева. Сигналом для субкультивирования служили 2 параметра: формирование клетками плотного монослоя и изменение цвета индикатора – компонента культуральной среды. Снятие клеток с подложки культурального флакона проводили с трипсином и без него. В случае проведения снятия клеток с подложки старого культурального флакона перед рассадкой клеток в чистые флаконы без трипсинизирования культуру клеток промывали несколько раз раствором Дульбекко в объеме 10–12 мл.

Оценку клеточного состава проводили приготовлением мазков и окрашиванием их толуидиновым синим на выявление тучных клеток и гематоксилином и эозином на выявление фибробластов, соответственно. Брали аликвоту (~ 0,5 мл) и наносили на предметное стекло, мазок фиксировали в этиловом спирте в течение 10–15 минут, затем высушивали, и только после полного высыхания окрашивали в растворе красителя в течение 30–45 минут, после этого мазок отмывали холодной водой от красителя.

Количество клеток в культуре оценивали путем подсчета клеток в камере Горяева. Оценку жизнеспособности культуры проводили тоже с помощью подсчета клеток в камере Горяева после обработки их красителем – трипановым синим. Для удобного подсчета клеточную суспензию разводили во столько раз, чтобы получить концентрацию клеток в ней не более $1 \cdot 10^6$ клеток.

Жизнеспособность культуры после внесения в нее лекарственного препарата оценивали с помощью МТТ-теста. Клеточную культуру разводили в 96-луночный планшет так, чтобы в каждой ячейке 24-луночного планшета оказалось по 350 000 клеток примерно. В 24 лунки раскапывали клеточную суспензию, содержащую тучные клетки, и добавляли в 23 из них лекарственный препарат (от 0,5 мкл/мл до 1000 мкл/мл) – стабилизатор мембран тучных клеток. В каждой лунке находилось по 1 мл суспензии клеток. Лекарственное средство кетотифен раскапывали в ячейки 24-луночного планшета в разных концентрациях: 1 мкг/мл суспензии, 2 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1000 мкг/мл. И одну лунку оставили под контроль, в ней была клеточная суспензия, без добавления лекарственного средства. Снятие показаний дыхательной активности клеток в культуре проводили с помощью планшетного спектрофотометра, мерили оптическую плотность раствора (D^*) после действия красителя. Тетразолиевый краситель превращается митохондриальными ферментами живых клеток в нерастворимый формазан, имеющий пурпурную окраску. С мертвыми клетками такого не происходит. Данные, полученные с планшетного спектрофотометра во время МТТ-теста, соответствуют определению среднего значения дыхательной активности клеток в культуре.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – ошибка среднего. Сравнение групп выполняли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия между показателями в разных группах считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе проведения экспериментальных работ по получению тучных клеток из перитонеальной жидкости у двух групп животных: с предварительным введением прозерина и без него была проведена количественная оценка клеток в суспензии, которая показала их двукратное повышение под действием прозерина [Таблица 1]. При этом в результате микроскопирования фиксированных окрашенных мазков суспензий в обеих группах были выявлены и тучные клетки, и фибробласты.

Таблица 1 – Количественная оценка клеточной суспензии в течение срока жизни культуры, 28 суток

Время культивирования	Количество клеток в 5 мл суспензии, $\times 10^6$	Количество клеток в 5 мл суспензии, $\times 10^6$
--------------------------	--	--

	Прозерин “-“	Прозерин “+”	Снятие трипсином	Промывка раствором Дульбекко
1 сутки	1,48±0,23	2,60±0,34		
2 сутки	2,40±0,54	3,48±0,91		
3–4 сутки			5,83±1,72	1,53±0,17
Субкультивирование				
7 сутки		2,03±0,26		2,03±0,26
9 сутки		1,46±0,11		1,46±0,11
15 сутки		0,84±0,06		0,84±0,06
28 сутки		0,83±0,02		0,83±0,02

В ходе субкультивирования параллельно проводили количественную и качественную оценку культуры. Анализ гетерогенности культуры на 7–9 сутки показал наличие в ней как тучных клеток, так и фибробластов. Следует отметить, что процедуру пассирования проводили со снятием клеток с подложки при помощи трипсина. Это означает, что трипсин не позволяет получить чистую культуру. Поэтому последующее субкультивирование проводили без трипсинизирования: только промыванием по 10–15 мл раствором Дульбекко трижды. Данная модификация позволила снять с подложки культурального флакона только одну группу клеток - тучные клетки [Рисунок 1].

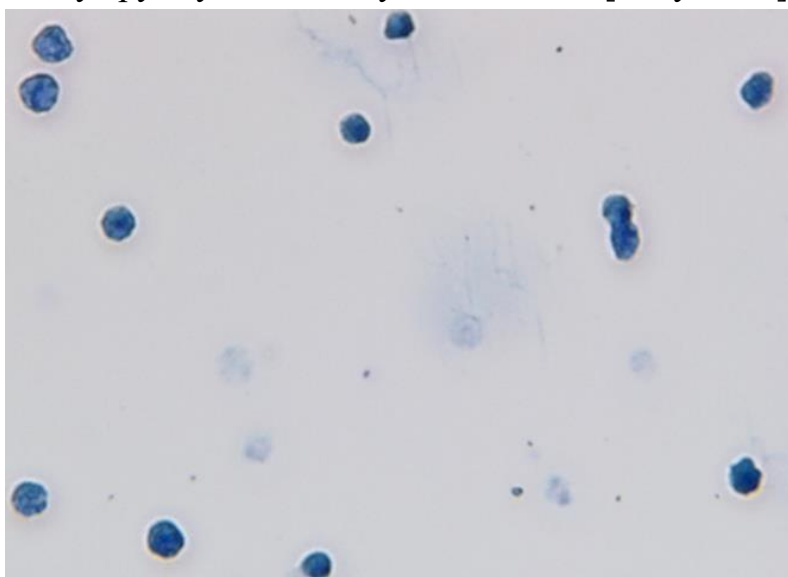


Рисунок 1 – Суспензия тучных клеток, окрашивание толуидиновым синим, 40X

Таким образом показано, что без применения трипсина в ходе пассирования фибробласты остаются прикрепленными к подложке культурального флакона, а тучные клетки легко вымываются раствором Дульбекко, что доказывается наличием тучных клеток и отсутствием фибробластов в мазках. Таким образом нам удалось получить чистую культуру тучных клеток.

Оценка жизнеспособности клеток проводилась в первые дни жизни культуры и составила ~ 95 %, на 7 и 9 сутки и составила 74 %, и в последние дни жизни культуры – 15 и 28 сутки и составила 59 % [Рисунок 2]. Данные свидетельствуют, что основное время снижения жизнеспособности приходится на первое время, что может быть связанным со временем адаптации клеток к новым условиям. После 9 суток жизнеспособность снижается уже не так быстро. Культуру сохраняли в течение 30 дней. Каждые 2–3 дня обновляли полную питательную среду для удаления из культуры продуктов жизнедеятельности клеток и насыщения их питательными веществами. По достижению жизнеспособности менее 60 % культура считается не пригодной для использования в исследовательских целях, поэтому был признан срок оптимального использования полученной культуры 3–4 недели.

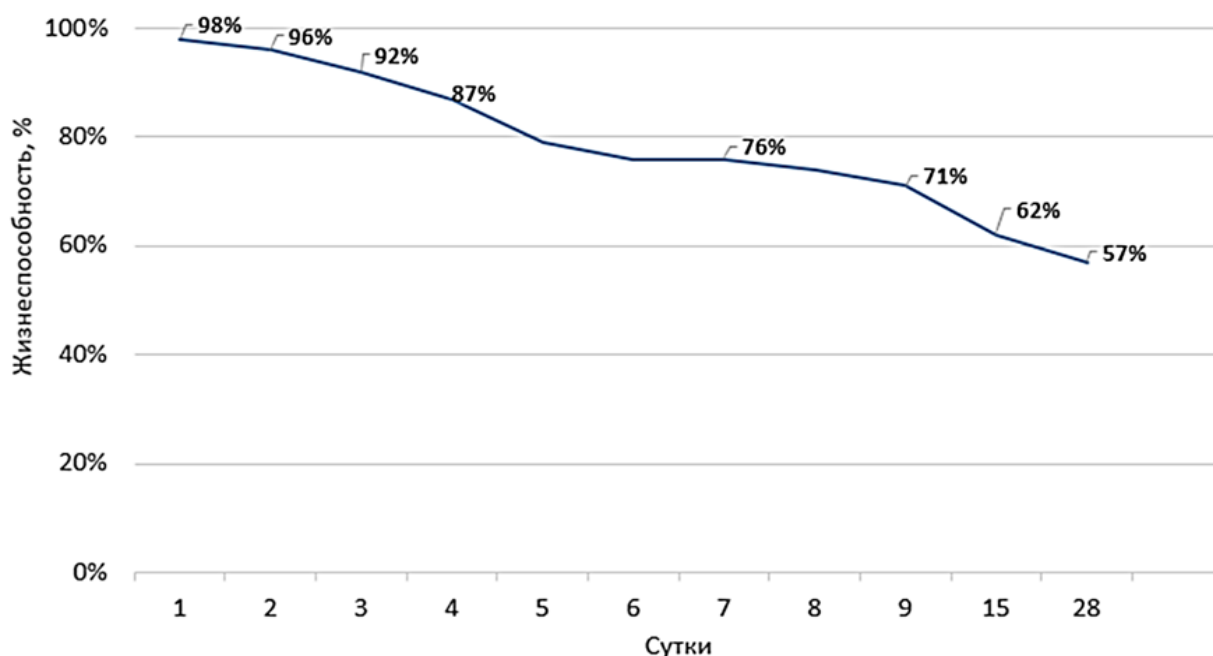


Рисунок 2 – Оценка жизнеспособности культуры

Для оценки использования данной культуры в доклинических исследованиях был проведен эксперимент с использованием препарата кетотифена. Лекарственное средство является стабилизатором мембран тучных клеток. С помощью МТТ-теста на жизнеспособность культуры была оценена реакция клеток на культивирование их с лекарственным препаратом. Реакция была положительной. При этом низкие концентрации препарата не повлияли на жизнеспособность клеток культуры, средние концентрации повысили её, что может быть связано со снижением их дегрануляционной способности и увеличением их срока жизни, высокие концентрации вещества оказались токсичными и значительно снизили жизнеспособность клеток [Рисунок 3]. Таким образом несмотря на непродолжительный период существования культуры

можно проводить фундаментальные исследования тучных клеток в культуре и тестировать на них лекарственные вещества.



Рисунок 3 – Оценка влияния кетотифена на жизнеспособность культуры тучных клеток, определение среднего значения дыхательной активности клеток в культуре МТТ-тестом

Заключение

Разработана методика получения культуры тучных клеток, клетки которой способны самостоятельно существовать в условиях *in vitro* в течение месяца, осуществлять процессы своей жизнедеятельности и реагировать на биологически активные вещества, вносимые в питательную среду культуры клеток.

На основании полученных нами результатов, мы можем предположить, что данная культура может стать полезной экспериментальной моделью как для фундаментальных исследований тучных клеток *in vitro*, так и для проведения доклинических испытаний специализированных лекарственных средств на данной культуре клеток.

Библиографический список

1. Mouse bone marrow-derived mast cells acquire responsiveness to substance P after co-culture with 3T3 fibroblasts in the presence of stem cell factor / Morita E., Hiragun T., Tanaka T., Kameyoshi Y., Okabe T., Hide M. and Yamamoto S // *Allergology International*. – 1998. – № 47. – P. 205–212.

2. Schmit D., Le D., Heck S. Allergic airway inflammation induces migration of mast cell populations into the mouse airway // *Cell Tissue Res.* – 2017. – № 1. – P. 20–23.
3. Silva E. Z., Jamur M. C., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell // *Histochem. Cytochem.: official journal of the Histochemistry Society.* – 2014. – V. 10, № 62. – P. 698–738.
4. Цибулькина В. Н., Цибулькин Н. А. Тучная клетка как полифункциональный элемент иммунной системы // *Аллергология и иммунология в педиатрии.* – 2017. – №2. – С. 4–11.
5. Cruse G., Kaur D., Yang W., Duffy S., Brightling C., Bradding P. Activation of human lung mast cells by monomeric immunoglobulin E // *Eur Respir J.* – 2005. – № 25. – P. 858–863.
6. Hypoxic mast cells accelerate the proliferation, collagen accumulation and phenotypic alteration of human lung fibroblasts / X. Wang, L. Lin, X. Chai, Y. Wu, Y. Li and X. Liu // *Int. J. Molecular medicine.* – 2019. – № 45. – P. 175-185.
7. Barrett N. A., Austen K. F., Dwyer D. F. Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system // *Nat Immunol.* – 2016. – № 17. – P. 878–887.
8. Burton O. T., Darling A. R., Zhou J. S. Direct effects of IL-4 on mast cells drive their intestinal expansion and increase susceptibility to anaphylaxis in a murine model of food allergy // *Mucosal Immunol.* – 2013. – V. 4, №6. – P. 740–750.
9. Isolation of Peritoneum-derived Mast Cells and Their Functional Characterization with Ca²⁺ imaging and Degranulation Assays / Tsilovsky V., Solis-Lopez A., Ohlenschlager K., Freichel M // *Journal of Visualized Experiments.* – 2018. – № 137. – P. 1–17.
10. Лейберова А.К., Храмова Ю.С. Разработка методики культивирования тучных клеток для создания экспериментальной модели // *Физика. Технологии. Инновации ФТИ-2021: материалы VIII Международной молодежной научной конференции.* Екатеринбург. 2021. С. 1102–1104.